



優先権主張  
 国名 アメリカ合衆国  
 出願日 1974年12月18日  
 出願番号 533,972

(4,000円)

特許願 (A)

昭和50年10月29日

特許局長 斎藤 英 彦 殿

1. 発明の名称

ヒドロキシベンゾイリニクニヒドロキシベンゾイリニクニ  
 生物学的流体中の物質を測定する指示器

2. 発明者

住所 アメリカ合衆国、ニューヨーク州 ヘイスティングズ  
 ・オン・ヘドソン サミット ドライブ 47

氏名 ヘリー ホーホストラー

3. 特許出願人

住所 アメリカ合衆国、ニュージャージー州 イースト  
 ラザーフォード スタンレイ アンド コーネリア  
 ストリート (無番地)

名称 ベクソン デイヤンソン アンド カ

代表者 ヘンリー オーサー サブリー

国籍 アメリカ合衆国

4. 代理人

住所 〒105 東京都港区芝西久保巴町25番地 鹿友ビル  
 電話 東京(434) 0667番

氏名 (7002) 井理士 松永 宣 行

明 細 書

1. [発明の名称]

生物学的流体中の物質を測定する指示器

2. [特許請求の範囲]

支持部材と、生物学的流体中に溶けた物質に対する複数の指示薬とから成り、該指示薬のおおのは該部材の別々の区域に位置し、そして該指示薬の少なくとも2種は溶液中の該物質の異なる濃度の存在を指示することを特徴とする生物学的流体中に溶けた物質の測定用指示器。

3. [発明の詳細な説明]

本発明は、生物学的流体中の化学物質の濃度の定量分析に使用する装置に関し、さらに詳しくは生物学的流体中のグルコース含量を定量するのに有用な使い捨て装置に関する。また、本発明は、本発明の装置を製作する方法と使用方法に関する。

従来、液体中のグルコース(および他の物質)の濃度を測定するのに有用である使い捨て装置は知られており、商業的に入手できる。簡単さ、低

⑨ 日本国特許庁

公開特許公報

①特開昭 51-75596

④公開日 昭51.(1976) 6.30

②特願昭 50-128420

②出願日 昭50.(1975)10.29

審査請求 未請求 (全12頁)

庁内整理番号

6804 4P  
 6807 4P

⑤日本分類

113 E6  
 113 A2

⑥Int.Cl<sup>2</sup>

G01N 31/22  
 G01N 31/16

価格、操作容易性および普及した使用に対してとくに重量なものは、グルコースと接触したとき色表示を生ずる試薬を有する吸収性物質のストリップまたは他の支持要素から成る簡単な装置である。このような装置の代表的なものは、米国特許第2,865,718号、同第2,848,308号、同第2,893,844号、同第2,981,606号、同第3,164,534号、同第3,212,855号および第3,791,988号に記載されている装置である。

先行技術の前記特許に記載されている装置は、すべて、たとえばグルコース含有溶液中に、短時間沈めることによつて操作する。グルコースと接触すると、装置の試薬要素は、化学変化を起こし、これは色変化によつてオペレータに視的に示される。一般に、色の変化の度合は浸漬液中のグルコース濃度の大きな測定である。たとえば、米国特許第2,981,606号の装置は、浸漬液中のグルコース濃度に依存して黄から緑ないし青への着色の変化を示す色表示を与える試薬組成物を用いる。ついで、この色表示と、既知のグルコース含量の

溶液へ試薬を暴露することによつて得られた色とを比較することによつて浸漬液中のグルコース含量を概算して百分率で表わす。実際には、二次的な色の比較図表を使用する。

先行技術のほかの装置は、特定の濃度以上でグルコースに感ずる単一の試薬を使用する。後者の装置も、米国特許第 2,893,844 号に代表されるが、試薬要素とグルコースとの反応により生成する色によつて視的表示をオペレータに与える。この装置はある範囲の濃度を示さないで、試験溶液中にあらかじめ決めた濃度のグルコースが存在するか、あるいはこの濃度を越えた濃度のグルコースが存在する場合にのみそれを示す。

先行技術の使い捨て装置は、試験溶液のグルコースまたは他の物質の含量の直接的数字の読みを得る手段を与えない。この定量に対して、色図表との比較を行なつて装置によつて記録された表示を数値に変換しなければならないか、あるいはある数の異なる最小グルコース濃度の定量に対して別々の指示装置を使用して複数回の試験を行なわ

なくてはならない。両者の装置はグルコース濃度の大まかな近似値を与えるだけであり、そして装置の使用者の能力によつて異なる色調を与える。

商業的に入手できる先行技術の装置のほかの欠点は、制限された操作規則に密接に従つてその装置を使用しなければならないということである。さらに詳しくは使用する試薬は最初検出すべき物質、たとえばグルコースと接触したのち反応しつづける。試薬によつて生ずる色は発現しつづけて可能なもつとも暗い色調となるので、定量において精度を要する場合浸漬後狭い特定の時間内に指示器を読まなくてはならない。オペレータが前記時間内で記録された表示の読みを含む臨界性を理解することを怠るか、あるいはそれを正確に行なわなかつた場合、誤つた読みが得られるであろう。本発明の指示器は使い捨てであり、溶解した物質の濃度表示を記録し、この表示は数値で直接読み取ることができ、可能な濃度のいかなる所望範囲にわたつても指示するであろう。さらに、本発明の指示器は溶液中に短時間浸漬したのちすぐに記

録を与え、このような浸漬後特定の時間内に「読み取る」必要はない。得られた表示の記録は暴露（とくにグルコースに対して）後かなり長時間安定であるので、正確な読みに対して記録を観察しなければならないとき、ある自由度が得られる。

さらに、本発明による装置は試験試料中の妨害物質の作用に比較的感ぜない。たとえば、尿中のグルコースの先行技術の定量の場合において、ある種の還元物質、たとえば 2,5-ジヒドロキシ安息香酸またはアスコルビン酸が尿中に存在するとグルコースの存在はマスクされる（たとえば Feldman et al., Diabetes, Vol. 19, No. 5, 337-343 参照）。

これにより診断において潜在的な誤差の総計が生じ、そしてある種の治療案を誤まつて投与したりまたは差し控えたりすることになる。しかしながら、本発明の装置および試薬を使用すると、このような妨害の影響は事実上排除される、すなわち先行技術の装置でみられる影響の 3 分の 2 に減少する。

本発明より前に知られているグルコース含有溶

液中のグルコース定量用の酵素を基剤とする組成物の代表例は、米国特許第 2,848,308 号、同第 2,981,606 号、同第 3,164,534 号、同第 3,721,607 号および同第 3,791,988 号ならびに文献 Morin et al., Clinical Chemistry, 10/9, 959-952 (1973)、さらに数多くの文献に記載されている。このような組成物の多くは本発明の指示器の製造に使用できるが、好ましい指示器は本発明の新規な組成物からなるグルコースに感ずる試薬を用いる。以後さらに詳しく説明する本発明の新規な組成物は、本発明の指示器の製造に有利に使用できる。この新規な組成物は、グルコースの定量にとくに有利な試薬であり、急速に作用し、予測される高められた貯蔵安定性をもち、前述のような本発明の装置に使用したとき妨害物質による影響の大きさが先行技術の装置および組成物の使用において見られる影響の 3 分の 2 に減少する。還元性またはきつ抗性化合物の当量比率対検出すべきグルコースの当量比率の比は約 1 : 1 ~ 5 : 1 の範囲内で変化しうが、

この比は実質的に化学量論的であることが好ましい。化学量論的とは、反応成分に対して化学的当量と実質的に同じ比率である量を意味する。本発明の組成物を使用するとき、この比は本質的に化学量論的であり、そのため容易に予測でき、製造において容易に調節できる。さらに、本発明の好ましい組成物を使用するとき、先行技術の装置（前記参照）の場合において、尿中に存在することがありかつ大量のグルコースをマスクする還元性物の妨害が比較的にないことが観察される。

本発明によれば、支持部材と、生物学的流体中に溶けた物質に対する複数の指示薬とから成り、該指示薬のおおのほは該部材の別々の区域に位置し、そして該指示薬の少なくとも2種は溶液中の該物質の異なる濃度の適当な記号、たとえばアラビア数字を記録させることにより、存在を指示することを特徴とする生物学的流体中に溶けた物質の測定用指示器が提供される。

本発明は、本発明の装置をつくる方法も含む。

また、本発明によれば、化合物含有溶液中に本

発明の装置を沈め、この装置を溶液から取り出し、化学物質の指示された濃度をこの装置から直接読み取ることからなる溶液中の化合物の濃度を測定する方法が提供される。この方法は溶液中のグルコースの濃度を測定するのにとくに有利である。

さらに本発明によれば、

グルコースオキシダーゼ、

西洋わさびのパーオキシダーゼ、

西洋わさびのパーオキシダーゼの存在で過酸化水素による酸化のさい色を生ずる化合物、および  
 硫酸インドキシル、尿酸、3,4-ジヒドロキシマンデリン酸、3-メトキシ-4-ヒドロキシマンデリン酸、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸、3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル酢酸、3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン、3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニルアラニン、5-ヒドロキシインドール-3-酢酸、5-ヒドロキシインドール-2-カルボン酸、5-ヒドロキシトリプトファン、クレアチニン、2,5-ジヒドロキシフェニル酢酸、 $\theta$ -ヒドロキシチラミン（ドバミン）、5-ヒドロキシトリプタミンおよび2,5-ジヒド

ロキサン安息香酸からなる群よりえらばれたきつ抗化合物、および

生物学的流体、たとえば血液、尿、涙、だ液などの存在でグルコース試示組成物のpHを約4〜約6に維持する緩衝組成物、  
 からなる新規なグルコース指示組成物が提供される。

この明細中で使用する「きつ抗化合物」は、ある方法で酸化された指示薬の蓄積を防止する化合物を意味し、その防止時間はその化合物がこのような反応で完全に消費されてしまうまでである。きつ抗化合物としては2,5-ジヒドロキサン安息香酸が好ましい。便宜上、用語「2,5-DHBA」を2,5-ジヒドロキサン安息香酸を意味するために以後時々使用する。

本発明の組成物は、本発明の装置の製造に使用するのに有用である。

本発明の指示器は比較的簡単であり、一回使用したのち処分することができる。この理由で、この指示器を「使い捨て」装置ということが出来る。

その最も重要な用途はほ乳類の尿および血液中のグルコース濃度の測定であるが、この用途に限定されず、いかなる生物学的流体中のいかなる物質の存在および濃度の測定にも使用できる。たとえば、適当な試薬をえらぶことによつて、本発明の指示器は、尿または尿素中のケトン類、アルブミン、窒素など、血しょうまたは血清中のカルシウム、タンパク質、アルブミン、コレステロール、トリグリセリド類、アルカリホスファターゼ、ビリルビン、尿酸などの濃度の測定に使用できる。

本発明の指示器は、複数の特定の試薬を有する支持部材から成る。支持部材は特定の構造物質を必要とする意味において臨界的ではないが、好ましい態様のいくつかの形を以後説明する。一般に、支持部材は試験すべき溶液に暴露する試薬を有することができるいかなる物質であることもできる。支持部材の特定の例は、ウエブ、棒、ストリップ、破片、シート、ロッドなどの形のガラス、金属、木材、紙；重合体、たとえばポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアルキレンアセテート、ポリカ

ーボネートなど；繊維材料などである。好ましい物質は吸収性物質、たとえば紙、吸収紙などの吸収性物質であり、これに試薬組成物の溶液を含浸できる。

本発明の指示器の試薬組成物は、支持部材へ付着させるため液体の形で調製することが好ましい。溶液の試薬組成物を支持部材へいつたん付着させると、これを乾燥して組成物が支持部材へ接着するようにする。一般に、試薬組成物の支持部材への接着は、支持部材が吸収性物質であるとき、都合よく行なわれる。従来使用されてきた不活性な充てん剤、結合剤、界面活性剤などを必要に応じて試薬組成物に加えることができる。ある種の結合剤、たとえば樹脂ガムを試薬組成物に加えて、これの非多孔質の支持部材、たとえば金属、ガラスまたは非多孔質の重合体への接着を有利に促進できる。優美な製品とするためには、本発明の装置のおおのの指示薬の区域における色変化は澄みわたり、鮮明で、あいまいでない、強く実在的である。本発明の装置がこの所望するものに合致

して機能する精度は、支持部材へ付着した試薬溶液の容積対試験溶液または生物学的流体中の浸漬間に試薬部位で吸収される試験溶液の容積の比に関係する。得られる精度に関して本発明の最も有利な装置は、前記の比が実質的に1:1であるものである。この最適比から離れれば離れるほど、指示装置の精度が失なわれる割合は大きくなる。

前述の好ましい比を得るために、好ましい吸収性支持部材の一定区域は溶媒中の試薬で完全に飽和されることが必要である。ついで、溶媒を蒸発して本発明の指示装置をつくる。試験する生物学的溶液に浸漬すると、吸収性物質の試薬を付着した部位は前述の所望の1:1の比で生ずる蒸発溶媒の容積に等しい容積の試験溶液を一般に吸収する。しかしながら、試薬の含浸区域が精確な定量できる部位を形成するように孤立されない場合、試薬は試験溶液中に浸漬されるときもとの付着部位を越えて運ばれることがありうる。これにより試験操作中吸収された試験溶液中の比率に関して試薬は希釈され、究極的には前述の所望の1:1

の比からの偏りが生ずる。したがって、指示薬が吸収性物質に支持されている本発明の好ましい装置は非吸収性または疎水性の物質でたがいに分離された複数の指示薬の部位を有することが好ましく、そして各部位は試薬の付着に使用した溶媒と試験する生物学的流体とのほとんど等しい容積を吸収することが好ましい。好ましい装置は、たとえば、試薬を含浸した複数の吸収性支持部材（おおののは、以後くわしく説明するように、試験する物質に対して異なる感度をもつ試薬を有する）を疎水性支持部材、たとえばポリエチレン、ポリプロピレンなどのような重合体樹脂の固体のストリップの異なる区域へ添付することによつて、つくることができる。このような装置を試験溶液中に沈めると、精確な容積の試験流体は指示薬の部位で吸収され、ついで指示薬は指示薬部位をつくるとき使用された付着溶媒中の付着濃度と精確に実質的に同じ濃度に希釈される。このような好ましい指示装置の例は、以後とくに第2および3図について詳しく説明されているものである。

本発明の指示薬の試薬成分は、分析する物質の定量的検出について知られており、そしてこのような物質の溶液中の特定濃度に暴露したとき視的表示を与えるいかなる試薬であつてもよい。複数種のこのような試薬を支持部材上に位置させ、おおのは支持部材の異なる区域に存在し、そしてこれらの試薬のうちの少なくとも2種は溶液中の物質の異なる濃度を指示する。このような試薬とそれらの調製法はグルコースの試験の場合において一般に知られている。グルコースの定量に使用できる試薬の例およびそれらの調製法は、米国特許第2,893,844号に記載されている。一般に、このような試薬は、グルコースオキシダーゼ活性をもつ酵素、パーオキシダーゼ、過酸化水素とパーオキシダーゼとの存在で色変化する指示薬、ならびに酸化され指示薬の蓄積をなんらかの方法で防止しその防止をこのような反応でそれ自体が完全に消費されてしまうまでの時間つづける化合物からなる。このような化合物は、前述の酵素による転化において生成する酸化された指示薬が存在

するとこれを還元するのに十分に反応性である還元剤であることが好ましい。この化合物の例は、よく知られており、アスコルビン酸などである。このような化合物のリストは米国特許第 2,893,844 号に多く記載されている。

同じ効果を達成する別の方法は、'Screening Method for Glucose of Blood Serum Utilizing Glucose Oxidase and an Indophenol Indicator', Leonard Dobrick, *J. Biol. Chem.*, 403-409 (1958) に記載されている。

グルコース濃度の検出に使用される本発明の指示器を製造するのに使用する好ましい試薬は、本発明の前述の組成物を構成するものである。本発明の組成物は、グルコースオキシダーゼ、パーオキシダーゼ、きつ抗化合物、パーオキシダーゼの存在で過酸化水素と接触して酸化されて色を生ずる化合物、および生物学的流体の存在で試薬組成物の pH を約 4~約 6 に維持する緩衝組成物を混合することによつて調製される。

本発明の組成物の調製において使用する好ましいグルコースオキシダーゼは、かびから得られるグルコースオキシダーゼである。このようなグルコースオキシダーゼは一般によく知られており、たとえば米国特許第 2,981,606 号に記載されている。

パーオキシダーゼは一般によく知られているクラスの酵素であり、米国特許第 2,981,606 号に記載されているような既知のパーオキシダーゼのいずれをも本発明の組成物の調製に使用できる。西洋わさびのパーオキシダーゼは、本発明の装置の製造に好ましいパーオキシダーゼである。

過酸化水素により酸化されたとき色を生成する化合物は一般によく知られており、たとえば米国特許第 2,981,606 号および同第 3,721,607 号は過酸化水素とパーオキシダーゼの存在で色を生成する色生成物質を記載している。本発明のグルコース指示薬に使用できるこのような化合物の例には、次の物質が含まれる。

(1)、モノアミン、たとえばアニリンおよびその

誘導体、オルトトルイジン、パラトルイジンなど、

(2)、ジアミン、たとえばオルトフェニレンジアミン、N,N'-ジメチル-パラ-フェニレンジアミン、N,N'-ジエチルフェニレンジアミン、ベンジジン（これは青色またはかつ色を生ずる）、ジアニジン（緑またはかつ色に変化する）など、

(3)、フェノール、たとえばフェノールそれ自体（黄色を生ずる）、チモール、オルトクレゾール、メタクレゾール、パラクレゾール（これらのクレゾールはそれぞれ緑黄色、ピンク色およびミルク状けん濁物を生成する）、アルファナフトール（マゼンタ色を生成する）、ベータナフトール（白色沈澱を形成する）など、

(4)、ポリフェノール、たとえばカテコール、グアヤコール（オレンジ色を生成する）、オルシノール、ピロガロール（赤みがかった色または黄色を生成する）、p,p'-ジヒドロキシジフェニルおよびフロログルシノール、

(5) 芳香族酸、たとえばサリチル酸、ピロカテクン酸および没食子酸、

(6)、ロイコ染料、たとえばロイコマラカイトグリーン（マラカイトグリーンを生成する）およびロイコフェノールフタレイン（望ましくはアルカリ性媒体中で使用する）、

(7)、着色した染料、たとえば 2,6-ジクロロフェノールインドフェノール、

(8)、種々の生物学的物質、たとえばエピンエフリン、フラボン類、チロシン、ジヒドロキシフェニルアラニン（オレンジ-赤みがかった色を生成する）およびトリプトファン、ならびに

(9)、ほかの物質、たとえばグリヤツクゴム、グアヤコン酸、ナジ試薬（青色を生成する）カリウムナトリウム、およびほかの水溶性ヨウ化物、およびビリルビン（緑色を生成する）。

本発明の組成物に使用できる緩衝組成物は、一般によく知られており、たとえばリン酸ナトリウムとリン酸ナトリウム-水和物との混合物およびクエン酸とクエン酸三ナトリウムとの混合物がこれに含まれる。

本発明の組成物の各成分は、ふつうの技術を用

いて水のような溶媒の存在で混合する。混合の順序には制限はないが、一般にきつ抗化合物の成分を最初に加えることが好ましい。ついで、本発明の新規な組成物の溶液を使用して、支持部材上に組成物を付着させて、本発明の指示器をつくる。

本発明の代表的な好ましい組成物は、次の比率の成分を使用して調製されたものである。約40  $\mu$ g 以上のグルコースオキシダーゼ、約60以上/μgのビルピロガロリン単位のパークシンダーゼ、約0.05～約15%の酸化のさい色を生成する化合物、および約0.01～約5.0%のきつ抗化合物であり、これらすべては100マイクロリットルの試薬当りの量である。緩衝化合物は、生物学的流体の存在で組成物をpH 4～6の範囲に維持するのに十分な量である。

本発明の試薬組成物の反応中生ずる色の変化によつて「指示される」溶液中のグルコースの精確なレベルまたは濃度は、本発明の組成物を調製するとき使用するきつ抗化合物の比率によつて測定される。一定比率の化合物が指示薬の染料の還元

において消費されるとき、最低レベルのグルコースの指示が生ずる。きつ抗化合物の比率を変化させることにより、溶液中のグルコースの異なる最小濃度を「指示する」試薬組成物を調製できる。溶液中のグルコースの特定濃度の存在を指示する試薬を得るために必要なきつ抗化合物の適切な比率は、数学的に容易に計算できるか、あるいは、試行錯誤によつて決定でき、そして実質的に化学推論的方法で反応するグルコースの量に関係する。

次の実施例により、本発明をさらに説明する。これらの実施例において、すべての部は特記しないかぎり重量による。

#### 実施例 I

(A) 適切な容器に、300  $\mu$ l (マイクロリットル)のグルコースオキシダーゼの溶液 (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, Catalog No. G-6500; 1200  $\mu$ g/ml /mg) の活性をもつかびからグルコースオキシダーゼ)、150  $\mu$ l の西洋わさびのパークシンダーゼの溶液 [37.5%の西洋わさびのパークシンダーゼ

(Sigma, supra, Catalog No. P-8250) を1.0mlの0.01モルのクエン酸塩の緩衝液 (pH 5.5) 中に溶かすことによつて調製した)、300  $\mu$ l の2,2'-アジノ-ジ- (3-エチル-ベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) の溶液 [50%の2,2'-アジノ-ジ- (3-エチル-ベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (Boehringer Mannheim Corporation, New York, New York, 製品 No. 15594) を1.0mlの0.1モルのクエン酸塩緩衝剤、pH 5.5に溶かすことによつて調製した)、50  $\mu$ l の2,5-DHBAの1%使用溶液、合計1,250  $\mu$ l とするに十分な量を供給する。

(B) 適当な容器中で0.5%の2,5-ジヒドロキシン安息香酸を4mlの水中にスラリー化する。このスラリーにかきまぜながら水酸化ナトリウムの水溶液を透明な溶液が得られるまで加える。これを原料10%溶液として使用する。0.1モルのクエン酸塩緩衝剤、pH 5.5で適当に希釈して使用1%溶液を調製する。

(C) 4個の別々の適当な溶液のおのの、上記

(A)で調製した指示薬の溶液の75  $\mu$ l を供給する。ついで各容器に上記(B)で調製したいろいろな比率の1%の2,5-ジヒドロキシン安息香酸溶液と、上記(A)に記載した変化量の緩衝剤を混合しながら加えてグルコース指示薬溶液を得る。それらのおのおのは溶液中のいろいろな最小濃度のグルコースに暴露すると、実質的に無色から褐色への変化によつて視的に指示する。4個の容器を文字AないしDで標示する。各容器中の2,5-ジヒドロキシン安息香酸および緩衝剤の濃度ならびに各試薬組成物AないしDが色変化によつて指示する溶液の最小グルコース濃度を下表Iに示す。

表 I

容器	緩衝剤 ( $\mu$ l)	2,5-DHBA ( $\mu$ l)	2,5-DHBA の濃度	指示を生ずるのに必要 な溶液中の最小グル コース濃度 (%)
A	25	0	0.3%	0.1%
B	21	4	0.75%	0.25%
C	13	12	1.5%	0.5%
D	0	25	2.8%	2.0%

同様に、上記実施例 I、一部 A の操作に従うが、2,5-DHBA の代わりに等しい比率のそれぞれ硫酸インドキシル、尿酸、3,4-ジヒドロキシマンデリン酸、3-メトキシ-4-ヒドロキシマンデリン酸、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸、3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル酢酸、3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン、3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニルアラニン、5-ヒドロキシインドール-3-酢酸、5-ヒドロキシインドール-2-カルボン酸、5-ヒドロキシトリプトファン、クレアチニン、2,5-ジヒドロキシフェニル酢酸、 $\theta$ -ヒドロキシトラミン(ドパミン)および5-ヒドロキシトリプタミンを使用すると、本発明の指示装置の製作に有用なグルコース指示薬が得られる。

## 実施例 II

円形のディスクの5組の系をつくる。各組は4個のディスクからなり、そして各ディスクは#52 ホワットマン(Whatman) 紙から直径4mmの円を切るることによって作る。ついで、各組のディス

クディスクの色の変化を観察する。結果を各ディスクに存在するものと計算された2,5-ジヒドロキシアニソ酸の比率と一様に、下表 II に記載する。

特開 昭51-75596(7)

クを上記実施例 I で調製したそれぞれ試薬溶液 A、B、C および D の異なる1種の約0.002ml でぬらす。湿ったディスクを空気乾燥する。各ディスクは、乾燥したとき計算すると、約0.6  $\mu$ g のグルコースオキシダーゼ、1.2  $\mu$ g のパーオキシダーゼ、18  $\mu$ g のクエン酸塩緩衝剤、24  $\mu$ g の2,2'-アジジンジ-(3-エチル-ベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)と変換比率の2,5-ジヒドロキシアニソ酸を含有する。ついで、各組の乾燥したディスクを単一の紙に取付け、各ディスクをその調製に使用したそれぞれ特定の試薬の A、B、C および D に対応して a、b、c および d としるしをつける。ついで、4枚のディスク a ~ d の別々の組を有する4枚の紙のストリップのおののを、グルコースをそれぞれ0.1%、0.25%、0.5% および2.0% 含有する4種の水溶液のおののに浸漬する。第4番目のストリップは対照ストリップであり、蒸留水に浸漬する。各ストリップを溶液中に約1秒間浸漬し、ついで取り出す。約1分以内の浸漬で、各ストリップに取付けられ

表 II

ストリップ の番号	浸漬溶液 中のグル コースの %	ディスク の番号	1枚のディスク当りの 2,5-ジヒドロキシア ニソ酸の比率 ( $\mu$ g)	色の変化 / 字
1	0.1%	a	0.6	あり
		b	1.4	なし
		c	3.0	なし
		d	5.6	なし
2	0.25%	a	0.6	あり
		b	1.4	あり
		c	3.0	なし
		d	5.6	なし
3	0.5%	a	0.6	あり
		b	1.4	あり
		c	3.0	あり
		d	5.6	なし
4	2.0%	a	0.6	あり
		b	1.4	あり
		c	3.0	あり
		d	5.6	あり
5(対照)	0.0%	a	0.6	なし
		b	1.4	なし
		c	3.0	なし
		d	5.6	なし

得られた色変化は明確な暗色化で強く実在的であり、色変化しなかつたディスクは感知しうる暗色化を示さなかつた。得られた記録は少なくとも72時間安定であつた。これは先行技術の商業的に入手できるグルコース指示器では不可能であり、この指示器は通常数分以内に読まねばならない。

本発明の指示器および方法を、添付図面に示される特定の態様を参照しながら、さらに説明する。

第1図は本発明の指示器20の斜視図である。指示器20は支持部材からなり、この支持部材は第1図において平らなストリップ18として示されており、好ましくは、吸取り紙のストリップのような吸収性物質である。数字1、2、3および4を形成するようにストリップ18上に試薬11、12、13および14がそれぞれ含浸されている。試薬11は上記実施例Iの組成物Aのような組成物であり、これは0.1%の最小グルコース濃度が溶液中に存在して試薬と接触するとき色変化によりそれを指示する。試薬12、13および14はグルコース含有溶液中のそれぞれ0.25%、0.5

を示す。しかしながら、グルコース溶液への浸漬により暴露すると、試薬は化学的に反応して色を生ずる。試験溶液中のグルコース濃度が試薬が色表示を与える最小グルコース濃度を超えると、このような色変化が生ずる。第1図において、数字1および2は暗い色調で示されており、グルコース濃度が0.25%と0.5%との間であるグルコース溶液中への指示器20の浸漬後得られた表示を例示する。試薬11および12は反応して「プラス2」、すなわち発色した最高の数の濃度を指示する。試薬11および12が発色して明確な充満数字を形成する鮮明かつ明確に色変化を生成することにより、使用者は試験溶液中の最小グルコース濃度の直接的読みを得ることができる。したがつて、本発明の方法は、試薬11、12、13および14を有する指示器の部分をグルコース含有溶液中にわずかの時間入れ、これを取り出し、そして記録された表示を視的に観察することによつて、実施できる。先行技術の使い捨て装置では必要であつたような、試験溶液のグルコース濃度を

特開 昭51-75596(3)  
および2.0%の最小グルコース濃度を指示する。支持部材18上の試薬組成物の位置づけはもういかなる都合のよい表示法であつてもよい。たとえば、aの一定試薬で指示された最小濃度は形状の配置であることができる、すなわち、たとえば上記の試薬11は形状「0.1%」で配置できる。第1図に例示にえらんだ数字1、2、3および4は、指示装置を尿試料中のグルコース濃度を測定するのに使用するとき、ことに有用である。このような表示は、ふつうの習慣により、尿中の0.1%のグルコース濃度を「プラス1」とし、0.25%の濃度を「プラス2」とし、0.5%の濃度を「プラス3」としそして2.0%の濃度を「プラス4」とすることに従つたものである。

使用前、第1図の態様において使用する記号1、2、3および4は、ストリップ18上で目に見えないかあるいはわずかな変色によりほんのわずかに判読できるのみである。数字3および4を示す破線は、数字3および4が部材18上にもとから形成されたものとしてはつきり判読できないこと

測定するために標準の図表と記録された色との比較を、本発明の方法では、行なわなくてよいことがわかるであろう。本発明の好ましい組成物を試薬11、12、13および14として使用すると、グルコース濃度の鮮明かつ明確な表示は約1分間以内で得られる。指示器上に記録された表示は比較的安定であり、比較的長い時間続くので、指示器20の浸漬および取り出し後少なくとも72時間までの間隔において、使用者は試験結果を再検査することができる。これは先行技術の装置では不可能である。

第1図に例示される態様は、特定の要求に合致するように多くの面で変更できることは明らかである。各試薬の感度は特定の要求に合致するように変更できる。支持部材へ適用する異なる試薬組成物の試薬の感度および数を選ぶことによつて、指示装置の異なる範囲と感度を得ることができる。第1図に示す指示器は尿のグルコース含量の試験にとくによく適するが、試薬組成物、指示の範囲および記録できる表示を適当に選ぶことによつて、



ほかの生物学的流体、たとえば血液、汗、尿および類似の生物学的液体をグルコース、アルブミン、ケトンおよび通常または異常にその中に見出されるほかの物質について試験するための使用に適する指示器が得られる。支持部材、ストリップ18を特定の色に染色して、グルコースの存在を指示する前に試薬組成物と配合するか、あるいはある色に染色して試薬が反応して記録を生成するとき非常に鮮かな対照を形成できる。

第1図に示す基本的指示器について行なり変更のほかの例として、第2図について説明する。第2図は指示器22の等角図であり、この指示器22は前記の支持部材18から成り、この部材18上に「プラス型」の吸収性物質のブロック5が収付けられている。各ブロック5は第1図に関して前述したそれぞれ試薬11、12、13および14の溶液に含浸され、ついで乾燥したのち支持部材18上に固定される。指示器22をグルコース含有溶液中に短時間沈めると、ブロック5に担持された試薬は前述のように反応し、グルコースレベ

ルが特定の試薬の最小指示濃度を超えると、その試薬を担持するブロック5の色変化を視的に観察できる。色変化した「プラス」を数えることにより、オペレーターは装置を直接読むことができる。図示されている装置22において、「プラス-2」が指示されている。すなわちこの装置は0.25%と0.5%との間のグルコースを含有する溶液に暴露された。

第3図は第2図の装置22に類似する別の態様であり、吸収性ブロック6の形が十字ではなくて長方形であることにおいて本質的に異なる。この態様は第2図の装置と同じ方法で操作し、ここに示されているように「プラス-3」の濃度範囲のグルコースの溶液に暴露されている、すなわち、この試験溶液はグルコース濃度が0.5~2%であった。

第2図および第3図の態様は、支持部材18が疎水性物質、たとえばポリエチレンであるときとくに有利である。ついで、ブロック5および6のおのおのは、浸漬のさい試験する生物学的流体の

一定容積を吸収する。溶液中の指示薬11、12、13および14でブロック5および6を飽和させ、ついで試薬の溶媒を蒸発することによつて指示薬11、12、13および14がブロック5および6に配置されたとき、試験溶液中への浸漬のさいブロック5および6に吸収される試験溶液の容積は指示薬を配置するためブロック5および6から蒸発された溶媒の容積に実質的に等しいであろう。これは溶液中の試薬の容積が前述のようにして吸収された試験溶液の容積の好ましい比であり、本発明の高度に精確なかつ精密な指示装置を生ずる。

前述の第2図および第3図の態様に従う本発明の好ましい指示装置の製作は、特定寸法の吸収性支持部材の調製、特定濃度の指示薬を含有する試薬溶液の特定容積の支持部材への飽和およびその支持部材上の乾燥の必要性のため、比較的費用がかかることがあることがわかるであろう。本発明の方法によれば、第2図および第3図に例示されているような本発明の高度に精確なかつ精密な指示装置は上に概説したようないくつかの必要性を避

けて製作できるので、製作費が減少されかつ改良された指示器が提供される。

改良された製法は、吸収性物質を指示薬でスラリー化または溶解し、このスラリーまたは溶液を疎水性支持部材上に配置し、そして溶媒を蒸発させて支持部材へ接着した指示薬と吸収性物質との乾燥混合物を残すことからなる。溶媒中の吸収性物質と指示薬とのスラリーは、ふつりの装置または技術を用いて微細な形の吸収性物質と溶媒中の試薬とを混合することによつて、調製できる。一例として、水に溶かした本発明の組成物と混合したセルロース粉末のスラリーまたはほかの吸収性物質の溶液を調製し、ポリエチレンの膜上へ付着させ、乾燥することができる。

第4a、4b、4cおよび4d図は、本発明のさらにほかの態様を例示する。指示装置はこれらの図面において数字24で表わす。第4a図において、指示器24は前述のような支持部材18から成るが、前述のような試薬11、12、13および14を連続して支持するので、試薬11は記号1の形

で配置され、試薬12は記号2の形で配置されかつ試薬11によつて形成された記号1を取り囲む区域にも配置される。同様に試薬13は記号3の形で配置されかつ記号2を取り囲む区域にも配置される。試薬14は記号4の形で配置されかつ記号3を取り囲む区域にも配置される。この態様において、特定のレベルのグルコース含有溶液への暴露は試験溶液中のグルコースの最小濃度を数字で表わし、これより低い濃度のグルコースに対する数字の記号を消してしまうだろう。たとえば、第4図は破線により感度のないグルコースの特定濃度を記録しない試薬組成物12、13および14の区域と表示への配置を示す。数字1は肉太の輪郭線で「プラス1」のグルコース濃度の表示として表わされ、第4a図に示された指示器24が少なくとも0.1%のグルコースを含有する溶液に暴露されたことを意味する。

第4b図について説明すると、0.25~0.5%のグルコースを含有する試験溶液中に指示装置24を短時間浸漬して得られた記載が示されている。

数字2が記録されて、免色した数字1が消去されている。これは試験溶液中の「プラス2」の濃度を明瞭に指示している。第4c図は指示器24が0.5~2.0%のグルコースを含有する溶液中に浸漬された時に記載された表示を示し、そして第4d図は2.0%より多い量のグルコースを含有する溶液に指示器24を浸漬したさい記録された表示、すなわち「プラス4」を示す。

第5図は、0.25~0.5%のグルコースを含有する溶液中に浸漬することによつて使用したのちの本発明の好ましい指示器の等角図である。この好ましい指示器26は、尿分析にとくに有用であり、支持部材として吸収性物質30から成り、吸収性物質30は剛性の支持部物質、たとえば重合体のプラスチックのストリップ32、たとえばポリエチレン、ポリプロピレンなどの重合体物質のストリップへ積層されている。孔35、36、37および38はプラスの記号の形で支持ストリップ32に切られており、その区域において前述の種々の試薬11、12、13および14で含浸され

た支持部材30が直なる。このように、試薬11、12、13および14を有する支持部材30の種々の区域は、それぞれ対応する孔を経て見られる。さらに、支持部材30のある区域は酸性のpHに感ずる試薬が含浸されている。支持部材30の試薬9を含浸した区域は、ストリップ32に切つた孔39を経て見ることができる。試薬9を含浸した区域の目的は対照として作用することである。指示器26を尿中に浸漬してそのグルコース含量を測定するとき、試薬9と尿との接触は色変化を記録する。ついで、部材30上の試薬9より下の試薬の区域のすべては尿溶液と接触し、したがつて試薬11、12、13および14は尿試料に暴露されたことが確認される。

第6図は第5図の線6-6からの断面図であり、剛性の支持ストリップ32中の切つた区域35、36、37、38および39の下で支持部材30の取付けをさらに詳細に示す。第5および6図に例示されるこの態様は、尿試料中の浸漬のさい、暗色化した表示の計数により容易に計算されるブ

ラス単位で記録されたグルコースレベルの視的表示を直ちに与える。したがつて、第5および6図に示された濃度は、例示のため、「プラス2」の値のグルコース濃度を記録した。

第7図は本発明のほかの指示器の態様の斜視図であり、この指示器は液体中に溶けた物質の濃度をより正確に測定するのにとくに有用であり、そして潜在的に広い範囲の可能な濃度をもつことができる。たとえば、この指示器70はほ乳類の血液試料のグルコース濃度の測定に有用である。指示器70は透明もしくは高度に透明な支持部材72、たとえば透明な酢酸セルロースのシート、ポリエチレンのフィルム、透明化された紙などの物質から成る。部材72上に種々の試薬、たとえば前述の試薬11、12、13および14が配置されており、中間的な感度の試薬組成物がそれらの試薬の間に図示されるように配置されている。グルコースの溶液、たとえば血清に暴露する前は、種々試薬でカバーされた区域は比較的無色である。血清の試料を試薬を有する部材72の表面上に塗り、

血液試料に見出されるグルコース濃度のレベルでそれらの試薬を発色させる。試器70は手で保持する光学的補助具によりあるいはそれを十字線75を有する投光器内に入れることによつて、「読み取る」。十字線75は参照グリッドを投影し、これは指示器70の上の投影によつて重ねられ、これによつて70上に記録された表示は拡大されかつ投影された像中に容易に観察される。もちろんこの指示器を投光器の助けをかりないで直接読むとき、透明の支持部材は不必要である。

第7図に關して説明した本発明の態様は、読み取り補助具、たとえば光学的装置および電気機械的装置を備えて本発明の指示器の読み取りを助ける本発明の他の面の代表例である。さらに詳しくは、本発明の指示器は、基本的には、指示装置の支持部材成分上のある区域の色変化、暗色化または不透明化によつて、機能する。この装置の読み取りは特定の量の反応または指示された区域の観察に依存する。したがつて、指示器の実際の読みは、光の透過、光の反射、光の散乱、電導性、放

射活性などのによつて識別できるレンズ、鏡、フィルター、投影器、検出器などを使用して記号を計数するように設計された道具によつて機械的に実施できる。したがつて、本発明の指示装置の読みは、光走査器などの助けによつて機械的に実施できる。本発明のこの面は、多数の異なる試薬の区域をもち、各区域が微細な点の寸法かあるいは肉眼で容易に観察できない寸法である本発明の指示装置に使用するのにとくに適する。このような装置は最小量の試薬を使用するということにおいてとくに有利であり、かなりこじまりしていて、試験溶液中に存在する広い範囲の可能な濃度にわたつて大きな精度の読みを提供できる。

本発明の指示器は、前述のものになんら限定されない。たとえば、試験試料へ暴露する前後に、反応区域にあらかじめ加えられてない試薬へ、または染色過程、たとえば熱、または可視的もしくは他の検出できる表示の出現を促進したり高めたりする目的で選択される他の化学的または物理的試薬に暴露できる。

#### 4. [図面の簡単な説明]

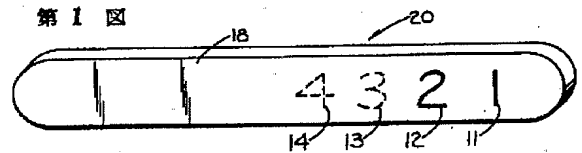
第1図はグルコース含有溶液中に使用する本発明の指示器の等角図、第2図は使用後の本発明の別の指示器の等角図、第3図は使用後の本発明のほかの態様の等角図、第4a、4b、4cおよび4d図はいろいろなグルコース含有溶液中に浸漬したのちの可能な表示記録を示す本発明の種々の指示器の態様の等角図、第5図はグルコース含有尿試料中に使用したのちを示す本発明の好ましい指示器の態様の等角図、第6図は第5図の線6-6からの縦断面図、第7図は本発明の別の態様の等角図である。

5, 6...ブロック 11, 12, 13, 14... 試薬または指示薬 18, 30, 72... 支持部材 20, 22, 24, 26, 70... 指示器または指示装置。

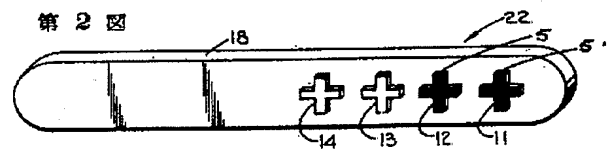
特許出願人 ベクトン デイキンソン アンド カンパニー

代理人 井理士 松 永 宣 行

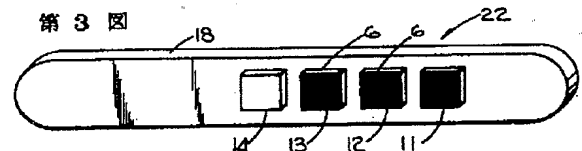
第1図



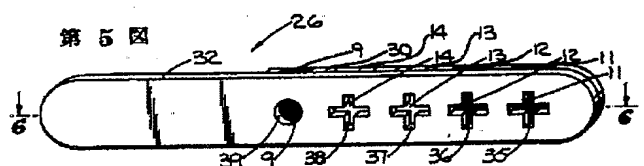
第2図



第3図



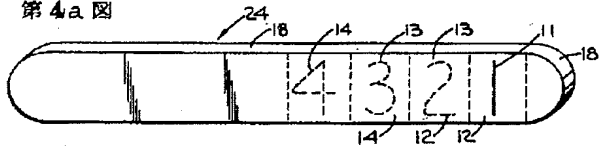
第5図



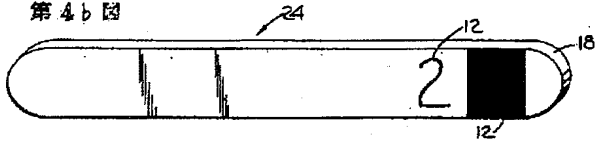
第 6 図



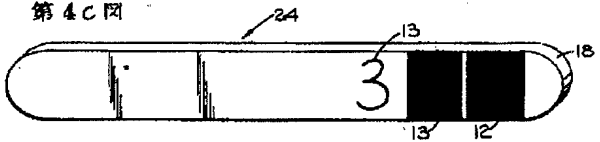
第 4a 図



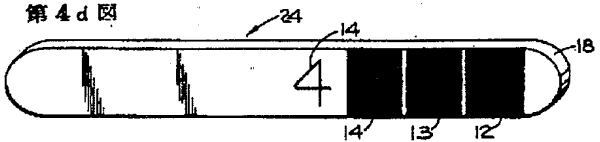
第 4b 図



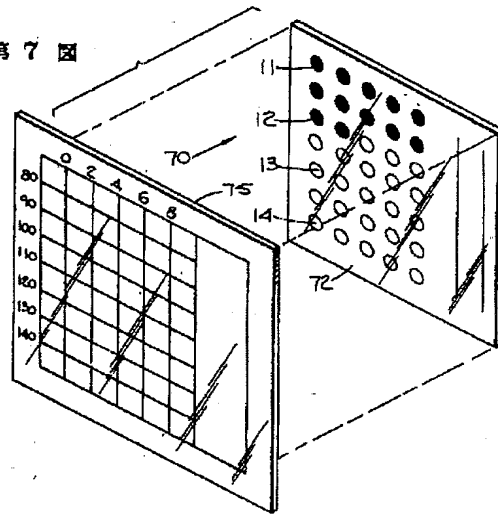
第 4c 図



第 4d 図



第 7 図



5. 添付書類の目録

(1) 委任状およびその訳文	各 1	通
(2) 優先権証明書およびその訳文	各 1	通
(3) 明 細 書	1	通
(4) 図 面	1	通
(5) 願 書 副 本	1	通